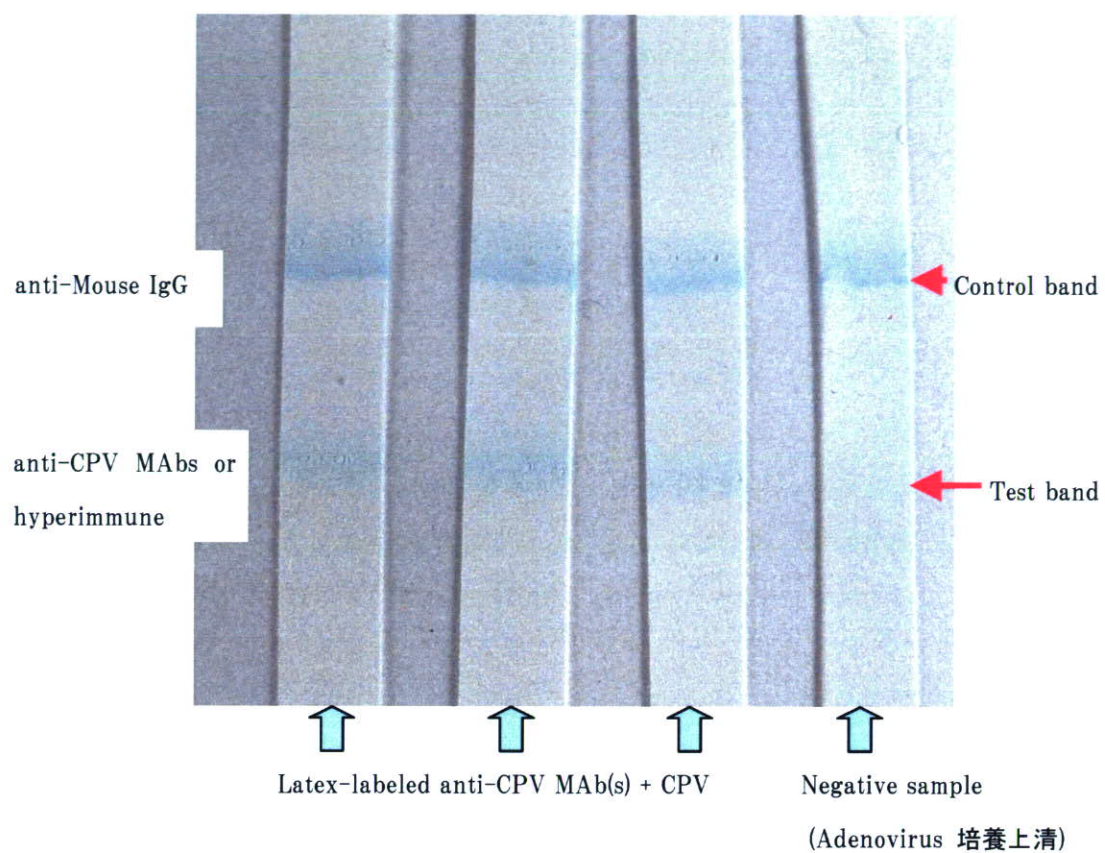


図 1 . Immunochromatograph 法 によるワクシニアウイルス抗原検出



平成 19 年度厚生労働省科学研究費補助金 地域健康危機管理研究事業
分担研究報告書

研究課題： バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理 (Ⅲ)

分担研究者 小倉 肇 岡山県環境保健センター所長

研究要旨:

今年度、電子顕微鏡的検査の精度管理参加は 27 地研であった。痘瘡ワクチン株ウイルス、インフルエンザウイルス、ネコカリシウイルス、アデノウイルス、麻疹ワクチン株ウイルスの固定標本を送付して精度管理を行った。正解率は、痘瘡ワクチン株ウイルス（ポックスウイルス）74.1%、インフルエンザウイルス（オルソミクソウイルス）92.6%、ネコカリシウイルス（小型球形ウイルス）74.1%、アデノウイルス 85.2%、麻疹ワクチン株ウイルス（パラミクソウイルス）33.3%であった。痘瘡ワクチン株ウイルスの精度管理結果は正解率が昨年度の正解率より向上した。経験したことが要因であろうと思われる。麻疹ワクチン株ウイルスは 2/3 の地研で正解が出せなかった。これは観察経験が無いために正しい判定が出来なかったことが原因の一つと思えたが、今回の貴重な経験を通じて経験を広め、技術習得に大いに役立ったと思われる。白金ブルーはウイルスを対象としたネガティブ染色の染色剤としては不適當であることが判明した。今後、国立感染症研究所を中心とした精度管理が継続され、地研の参加による更なる訓練と実践経験により、ウイルス検査機能が向上することを期待したい。

研究協力者:

藤井理津志 (岡山県環境保健センター ウイルス科長)
大瀬戸光明 (愛媛県立衛生環境研究所 衛生研究課長)
西村公志 (大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課主任研究員)
左近直美 (大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課主任研究員)
三上 稔之 (青森県環境保健センター 研究管理員)
宇田川悦子 (国立感染症研究所主任研究官)
H. Gelderblom (国立コッホ研究所教授、電子顕微鏡的ウイルス検査外部精度管理国際アドバイザー)

A. 研究目的

当研究では、地研における電子顕微鏡的ウイルス診断の精度管理を通じて、検査経験を積み信頼性確保と検査機能の向上を目的とした。

B. 研究材料と方法

1. 材料 精度管理用試料として、痘瘡ワクチン株ウイルス、インフルエンザウイルス、ネコカリシウイルス、アデノウイルス、麻疹ワクチン株ウイルスを用いた。

痘瘡ワクチン株ウイルス (LC16・チバ) はバイオテロ対策のために厚生労働省から各都道府県に配布されたもので、使用期限が終了したものを許可を得て使用した。インフルエンザウイルス (ワクチン株 (A/Wyoming/03/2003)) は発育鶏卵で培養したものを使用した。ネコカリシウイルス (F4 株) は細胞培養したものを使用した。アデノウイルス (3 型) は細胞培養したものを使用した。麻疹ワクチン株ウイルス (田辺株) は細胞培養したものを使用した。

新しい染色剤としての白金ブルー原液は、日新EMより分与された。

2. 固定剤 ウイルスの固定剤としてはパラフォルムアルデヒドを使用し、電子顕微鏡的ウイルス診断のためのウイルス固定法及びネガティブ染色法マニュアル (平成 18 年度改訂) 通りに調整した。固定の後、電子顕微鏡的ウイルス形態の比較をした (図 1)。

3. 精度管理 固定したウイルス標本を、まず研究協力者 (レファレンスセンター) に送付して診断してもらい、4 施設の内 3 施設以上が正解としたものを精度管理

に参加する地研宛にクール宅急便で送付した。なお、ウイルス診断の補助となりそうな検体に関する情報を検体送付時に加えた。1ヶ月の期限以内に回答を求め、結果を集計した。正解ウイルス名、正解率を模範的なウイルス電子顕微鏡写真像 (図 1) を添えてコメントと共に地研に還元した。

4. 染色剤の検討

ウイルスのネガティブ染色法は、ウイルスを観察する迅速・簡易な方法である。

現在使用されている染色剤は、リンタンングステン酸、酢酸ウランであるが、酢酸ウランは「核原料物質・核燃料物質及び原子炉等の規制に関する法律」第 6 1 条の 3 項に基づき国際規制物質使用許可を受けなければならない。そこで、電子顕微鏡超薄切片染色用に最近使用された、白金ブルーがネガティブ染色に使用可能かどうかを検討した。

5. 精度管理後アンケート

平成 17~19 年度の精度管理に一度でも参加し、回答のあった 41 地研に対して事後評価用アンケートを行った (別紙 1)。

C. 結果と考察

1. 精度管理の結果

表 1 に示すように、27 地研の参加・回答があった。精度管理正解率は痘瘡ワクチンウイルス (ボックスウイルス) 74.1%(20/27)、インフルエンザウイルス (オルソミクソウイルス) 92.6%(25/27)、ネコカリシウイルス (小型球形ウイルス) 74.1%(20/27)、アデノウイルス 85.2%(23/27)、麻疹ウイルス (パラミクソウイルス) 33.3%(9/27)であった。

痘瘡ワクチン株ウイルスの精度管理結果は正解率 71.4%であり、昨年度の正解率 51.6%より向上した。経験したことが要因であろうと思われる。2/3 の地研で現在問題となっている麻疹ウイルス（パラミクソウイルス）を正しく診断できなかつた。従来、地研では胃腸炎ウイルスしか検査する機会には恵まれず、ウイルス映像を見たことがないため正しく判定できなかつたのであろうと思われた。従って、今回の精度管理標本による観察はよい経験となったと思われる。

2. 白金ブルーによるネガティブ染色の検討

各研究協力者により、精度管理用固定化ウイルスに対して、リンタングステン酸又は酢酸ウランを使用したネガティブ染色と白金ブルー原液を使用したネガティブ染色を行った。その後で電子顕微鏡像を比較したところ、白金ブルーでは観察は不可能であることが判明した。超薄切片染色では使用可能でもネガティブ染色には残念ながら適用できなかつた。

3. 事後評価アンケート結果

38 地研から回答（回答率 92.7%）があり（別紙 2）、精度管理が有用であったとした地研が 100%で、今後も精度管理を継続すべきと回答した地研が 100%であった。継続する場合の担当機関として望ましい機関は、感染研（50.0%）と回答した地研が最も多かつた。電頭担当者が存在する地研は 31 地研(81.6%)で、これらの地研のうち担当者が不在後も継続して電頭観察の可能な地研は 28 地研(90.3%)であった。

D. 結論

1. 痘瘡ワクチン株ウイルスの精度管理

結果は正解率 71.4%であり、昨年度の正解率 51.6%より向上した。経験したことが要因であろうと思われる。

2. 麻疹ワクチン株ウイルスは 2/3 の地研で正解が出せなかつた。これは観察経験が無いために正しい判定が出来なかつたことが原因の一つと思えたが、今回の貴重な経験を通じて経験を広め、技術習得に大いに役立ったと思われる。

3. 白金ブルーは固定化ウイルスを対象としたネガティブ染色の染色剤としては不適當であることが判明した。

4. 精度管理の事後アンケートの結果から、精度管理は有用であったので、感染研等を中心として今後も継続してもらいたいという希望が多かつた。また、電頭担当者が存在する地研の大部分は、現在の担当が不在となった場合も、継続して使用可能な状態が続くと考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Kuzuya M., Fujii R., Hamano M., Nishijima M. and Ogura H.

Detection and molecular characterization of human group C rotaviruses in Okayama Prefecture, Japan, between 1986 and 2005.

J. Med. Microbiol. 79, 1219-1228 (2007)

2. 学会発表

1) 小倉肇、藤井理津志、大瀬戸光明、

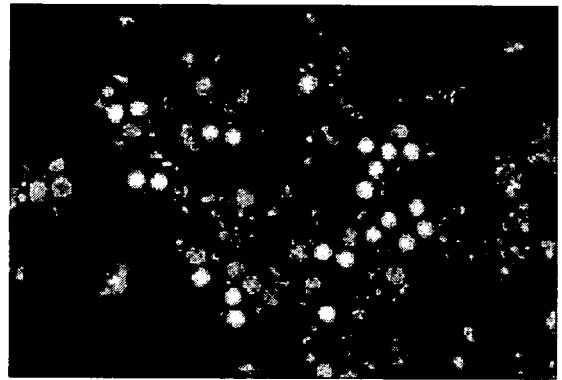
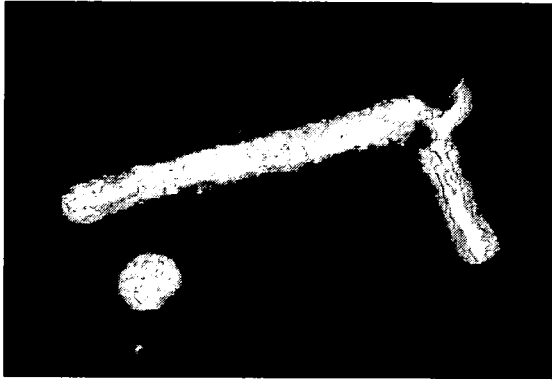
西村公志、左近直美、宇田川悦子、
後藤俊幸、 Gelderblom H.
バイオテロ等健康危機発生時の電子
顕微鏡的ウイルス検査の精度管理
第 23 回中国四国ウイルス研究会
2007 年 6 月 松山市

2) 濱野雅子、藤井理津志、葛谷光隆、
小倉肇、金谷誠久、国富泰二
2006/2007 シーズン岡山県における
Norovirus の流行状況と遺伝子解析
第 77 回日本感染症学会西日本地方会
2007 年 11 月 佐賀市

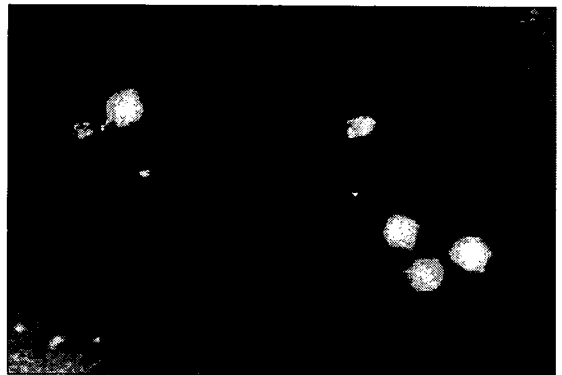
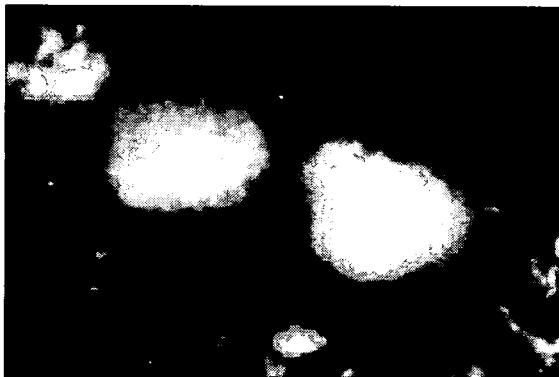
G. 知的財産権の出願、登録状況

なし

図 1 電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理標本

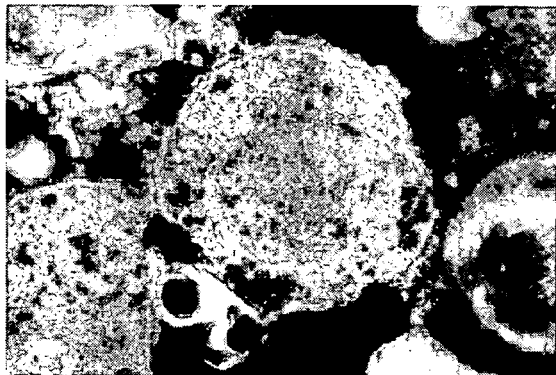


A : Orthomyxovirus (Influenza virus) B : Calicivirus (Feline Calicivirus)



C : Poxvirus (Vaccinia virus)

D : Adenovirus



E : Paramyxovirus (Measles virus)

表 1 精度管理正解率

検体	正解率 (全 27 地研)	
	正解地研数	%
A	25	92.6
B	20	74.1
C	20	74.1
D	23	85.2
E	9	33.3

図1. 電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理方法

電顕的ウイルス検査のための固定・染色法マニュアル作成, 各地衛研への送付

↓
ウイルス試料入手

↓
ウイルスの濃度調整・固定

↓
レファレンス研究所*によるチェック

↓
各地衛研への試料送付

↓
精度管理解答回収

↓
検査精度チェック

↓
各地研究に、その地研の解答内容・正解・正解率を還元した。

* 国立感染症研究所

愛媛県立衛生環境研究所

岡山県環境保健センター

大阪府立公衆衛生研究所

青森県環境保健センター

京都大学

平成 19 年度厚生労働省科学研究費補助金 地域健康危機管理研究事業
分担研究報告

研究課題：化学物質モデルにおける多検体（多成分）一斉迅速検査の精度管理等の検討

分担研究者

田中敏嗣

神戸市環境保健研究所長

研究要旨:

化学物質モデルにおける多検体（多成分）迅速一斉検査の精度管理について、地方衛生研究所の健康危機管理対応能力および技術能力の向上、精度管理の検討、連携の強化、情報の共有化等を目的に 3 年間調査研究を実施してきた。平成 17、18 年度は健康危機発生時に極めて有効な高性能機器である GC/MS および LC/MS について操作技術の向上および精度管理の検討を目的に化学物質モデルとして農薬を用い、地方衛生研究所間による共同試験を実施した。本研究では健康危機管理発生時の対応能力および原因化学物質の正確な究明と精度管理の向上を目的に未知の有機化学物質類、金属類、無機イオン類の検出・同定について、GC/MS、ICP/MS、簡易検査キットを用いて近畿地域 14 地方衛生研究所のグループ研修を 3 回および発表会 2 回を実施した。グループ研修には延べ 87 名が参加し、講義と実習により技術および精度管理の向上が図られ、発表会を含め 5 回の研修を通じて極めて有効な知識の習得、情報の共有と連携強化を図ることができた。

協力研究者:

伊藤光男、小島信彰、上田泰人、飯島義雄、渋谷一郎	(神戸市環境保健研究所)
大佛正隆、吉川英一	(滋賀県衛生科学センター)
井端泰彦、塩崎秀彰、日置 正	(京都府保健環境研究所)
大槻幸廣、川勝剛志	(京都市衛生公害研究所)
織田肇、田中之雄	(大阪府立公衆衛生研究所)
田窪良行、森義明	(大阪市立環境科学研究所)
田中智之	(堺市衛生研究所)
岡田卓郎、木村雅則	(東大阪市環境衛生検査センター)
山村博平、市橋啓子、三橋隆夫	(兵庫県立健康環境科学研究所)
南隆之、谷口秀子	(姫路市環境衛生研究所)
阪谷和彦、谷口誠	(尼崎市立衛生研究所)
足立修、素輪善典	(奈良県保健環境研究センター)
大橋友紀、山東英幸	(和歌山県環境衛生研究センター)
森野吉晴、木野善夫	(和歌山市衛生研究所)

A. 研究目的

健康危機発生時には、地方衛生研究所における迅速かつ的確な対応と、原因究明のための科学的根拠の正確性及び精度管理が求められる。また、健康危機管理では多様な化学物質に対する迅速で精度の高い分析能力も要請される。地方衛生研究所では、日常的に食品、家庭用品、大気、水質、土壌中の有害な化学物質を分析し高い潜在能力を有している。このため、健康危機管理に特に注目した組織内の業務態勢の整理、機器の整備をすることにより、危機への対応力をきわめて高度にすることが可能である。

本研究班では化学物質モデルにおける多成分迅速一斉検査の精度管理について、地方衛生研究所の健康危機管理対応能力および技術能力の向上、連携の強化、情報の共有化等を目的に3年間調査研究を実施してきた。平成17、18年度は健康危機発生時に極めて有効な高性能機器であるGC/MSおよびLC/MSについて操作技術の向上と精度管理能力を上げるための共同試験を行った。平成17年度は、低極性化学物質のモデルとして熱安定性の高い農薬を選び、GC/MSを用いて精度管理試験を行った。平成18年度は、極性をもつ化学物質のモデルとして、熱により分解しやすい性質を持つ農薬を選び、LC/MSを用いた精度管理試験を行った。

本年度は、危険性の高い未知化学物質に対する対応能力を向上を主眼におき、有機化学物質類、金属類、無機イオン類について、分析システムを高度に構築し運用している3地方衛生研究所において、近畿地域14地方衛生研究所からの参加者を対象に、

その内容の紹介とグループ実習を行い、技術、精度管理の向上を図ると共に、地方衛生研究所全国衛生化学技術協議会年会および近畿支部理化学部会で分担研究の内容を報告し、地方衛生研究所間の連携強化、知識習得、情報の共有等を図ることを目的とした。

B. 研究方法

1. 平成19年度研究実施内容

近畿地域の14地方衛生研究所（神戸市環境保健研究所、滋賀県衛生科学センター、京都府保健環境研究所、京都市衛生公害研究所、大阪府立公衆衛生研究所、大阪市立環境科学研究所、堺市衛生研究所、東大阪市環境衛生検査センター、兵庫県立健康環境科学研究所、姫路市環境衛生研究所、尼崎市立衛生研究所、奈良県保健環境研究センター、和歌山県環境衛生研究センター、和歌山市衛生研究所）の参加による研修および実習を以下に示す内容で実施した。実施回数は5回そのうちの3回は講義と実習を行った。

第1回研修会

日時：平成19年11月2日（金）

場所：神戸市環境保健研究所

内容：GC/MSによる有機化学物質の迅速同定について講義と実習を実施した。

第2回研修会

日時：平成19年11月15-16日（木、金）

場所：三重県総合文化センター

内容：平成18年度分担研究について、「第44回全国衛生化学技術協議会年会」において報告した。さらに、第3回、第4回研修について、意見交換し実施内容と健康危機

発生時の対応について論議した。

第3回研修会

日時：平成19年11月26日（月）

場所：京都府保健環境研究所

内容：ICP/MS測定による重金属類の検出について、講義と実習を実施した。

第4回研修会

日時：平成19年12月13日（木）

場所：兵庫県立健康環境科学研究所

内容：簡易検査キットを用いたシアンのおよびヒ素検出について、講義と実習を実施した。

第5回研修会

日時：平成20年2月1日（金）

場所：滋賀県衛生科学センター

内容：平成19年度分担研究について、「地方衛生研究所全国協議会近畿支部理化学部会研修会」において報告し、地方衛生研究所間の連携強化、知識習得、情報の共有等を図った。

2. 講義および実習について

第1回、3回、4回の研修会では講義と実習を行った。その内容について記載する。

2.1. GC/MSによる有機化学物質の迅速

同定

健康危機発生時の対応能力、精度管理向上を目的に神戸市環境保健研究所が開発した有機化学物質の迅速分析・同定システム Chemofind 2008 を用いて未知有機化学物質の迅速検出、同定について研修した。

Chemofind 2008 は①化学物質の迅速抽出、②GC/MSによる分析、③データベースによる検索の3工程から構成され、データベースには1997年に締結された化学兵器禁止条約で規定される化学剤とその原材

料、分解物など47物質を始め、農薬類が206物質、環境汚染物質262、悪臭あるいはフレーバー類を270物質、溶剤類を17物質、合計802物質を含んでいる。また、Chemofind 2008は、広範囲な有機化学物質を抽出、精製、濃縮して質量分析計に導入するための装置を多種類組み合わせることができ、迅速で精密な分析が可能なシステムとなっている。

研修ではまず、Chemofind 2008について説明し取扱の講義を行い、その後参加者29名を3グループに分け実習を行った。試料は食品（ご飯0.5g、または1.0g）に化学兵器の一種である表1に示した催涙ガス剤、2-クロロアセトフェノンと関連化合物を添加した。また、試料には保持指標を測定するためデカンからエイコサンの範囲のn-アルカンも併せて添加した。この試料中に含まれる化学物質を Chemofind 2008 システムを用い30分以内に同定するというブラインド分析実習を実施した。

抽出装置として固相マイクロ抽出装置（SPME）を用いGC/MS装置を組み合わせたシステムを3台使用し、それぞれのグループが未知物質の分析を行った。抽出条件を表2に、測定条件を表3に示す。

GC/MS測定で得られた化学物質のスペクトルと保持時間を Chemofind 2008 のライブラリーおよび保持指標データベースと比較、検索し、同定を行った。

なお、未知化学物質の検索同定を徹底するため、各班のリーダーを含め全ての参加者に添加している化学物質の情報を与えず、予備知識が全くない状態で化学物質の検索同定を実施した。

表1 添加した化学物質と添加量

物質名	濃度 (ppm)
2-クロロアセトフェノン	2.0
m-クロロアセトフェノン	0.4
p-クロロアセトフェノン	0.4
2-ブロモアセトフェノン	8.0
p-ジクロロベンゼン	0.2
o-ジクロロベンゼン	0.2

表2 SPME 抽出条件

ファイバー	65 μ m DVB/PGMS
	75 μ m Carboxen/PDMS
	50/30 μ m DVB/Carboxen/PDMS
抽出条件	60°C、10min.
試料	Rice、0.5g、1.0 g
バイアル	5ml、15ml セプタムトップバイアル、 テフロンシール

表3 測定条件

GC/MS	Agilent 5973 GC/MS、X2、 HP-5971 GC/MS
カラム	DB-5ms 30m、0.25mm、0.25 μ m
オーブン	40°C(2min.)-10°C/min.-240°C
温度	Injector 250°C、Interface 260°C
He	Constant Flow 0.70ml/min. 30.0cm/sec.

2.2 無機物質簡易検査キットによるシアン、ヒ素の迅速分析

兵庫県の毒劇物検査マニュアルに従い、簡易検査キット(メルコクアント)を用いて牛乳とお茶に添加されたシアンとヒ素を検出する実習を実施した。さらにシアンについては確認試験を、キャピラリー電気泳動装置を用いて行った。

2.2.1 簡易検査キットによる検査(茶、牛乳のシアン、ヒ素の測定)

(内容) 茶及び牛乳にシアン又はヒ素を添加したものを試料とし、簡易キットによる測定を実習した。

2.2.1.1 ヒ素の簡易検査

(1) 試薬等

メルコクアント・ヒ素テスト (テストストリップ、Reagent1、Reagent2)

(2) 試験方法

テストストリップを反応容器の蓋に取り付ける。

試料溶液 5ml を反応容器に入れる。

↓

Reagent1 (亜鉛末) を 1 さじ、続いて Reagent2 (塩酸) を 10 滴加える。

↓

すばやく反応容器に蓋をし、30 分間放置。

↓

テストストリップを取り出し、軽く水洗後、カラーチャートから濃度を判定する

(注意)

ヒ素濃度が高いほど多く発泡するので、泡がテストストリップに付着しないように注意する。カレー等の着色の著しい食品でも測定できるが、調製粉乳(粉ミルク)等のタンパク質の多い検体では多量の泡を生成し、テストストリップが泡に埋もれ

てしまい測定できない。

2.2.1.2 シアンの簡易検査

(1) 試薬等

メルコクァント・シアン化物テスト（テストストリップ、Reagent1、Reagent2）、pH 試験紙、25%硫酸

(2) 試験方法

試料溶液 5ml について pH を測定する。

↓

25%硫酸を用いて、pH を 6～7 に調整する。

↓

Reagent1 を 1 さじ、続いて Reagent2 を 5 滴加える。

↓

テストストリップを 30 秒間浸す。

↓

テストストリップを取り出し、10 秒以内にカラーチャートから濃度を判定する。

(注意)

シアン化物の発色は急激に退色するため、直ちに色を読み取る。色の濃い試液では判定が困難である。

2.2.1.3 キャピラリー電気泳動装置を用いた測定

茶にシアンイオンを 25ppm 添加して試料として用い、キャピラリー電気泳動装置によりシアンイオンの含有を確認した。

(1) 装置及び測定条件

装置：大塚電子(株)製 CAPI-3300

キャピラリー：内径 75 μ m、長さ 62cm（有効長 50cm）のヒューズドシリカ管

試料導入：加圧法（5 Kpa、3 秒）

キャピラリー温度：35 $^{\circ}$ C

印加電圧：-16kV

検出器：フォトダイオードアレイ（検出波長 230nm）

泳動緩衝液：大塚電子・無機陰イオン分析用泳動液 1

2.3 ICP-MS による有害金属類の分析システム

京都府が導入している ICP-MS を用いた有害金属類の同定システムと、マイクロウェーブを用いた食品等の試料の前処理法について研修を実施した。

参加者が、初級者から上級者までにわたっていたため、初級者にも理解しやすい内容の説明を行った。説明内容は大きく以下の 6 つに分けて行った。

(1) ICP 分析の基礎

ICP とは何か、どんな分析法なのかから始まり、ICP の概念図を経て、ICP 分析でなにができるかまで説明した。

(2) 装置の構成

ICP-AES と ICP-MS の構成及び構造とそれぞれの特長について説明した。

今後、標準装備となると想定される超音波ネブライザー等について説明した。

(3) 試料の前処理と実際の測定

測定手順（試料の前処理－検量線用標準溶液の調製－検量線の作成－測定）とそれぞれの手順における留意事項等を丁寧に説明するとともに、検出下限値の考え方や、ICP 分析の最適な条件等を説明した。

健康危機事象への対応において必須となる未知試料分析について、共存元素の濃度に応じた未知試料の分析フローを説明した。

(4) 測定干渉

測定干渉である物理的干渉、化学的干渉、イオン化干渉、分光学的干渉について説明し、ICP-AESにおける物理干渉、分光学的干渉への対応方法、ICP-MSにおけるスペクトル干渉への対応方法の例として、同重体や分子イオン除去システムについて説明した。

(5) 測定事例

飲料水の半定量分析、大気エアロゾル中のPd、Pt及びTh、U分析、降水中の鉛同位体比分析、前処理による金属元素の回収率の検討等の事例を紹介した。

(6) 装置見学

講義の後、当所に整備されているICP-MS装置を見てもらうとともに、マイクロウェーブ分解装置を見てもらい意見交換を行った。

C. 研究結果

1. GC/MSによる有機化学物質の迅速同定

試料中の未知化学物質をヘッドスペース-SPMEで抽出し、GC/MSで2~6回の測定を行い検出した各化学物質をChemofind 2008を用いて検索・同定したが、その結果を表4に示す。

2-ブロモアセトフェノンを除く5化学物質については3グループともに正解し、大変に優れた同定結果を得ることができた。ただ、2-ブロモアセトフェノンについては、添加から測定の間試料中で分解反応が生じ、感度が十分ではなかったため検出されなかった。

測定により得られた代表的なクロマトグラムと2-クロロアセトフェノンのマススペクトルを図1に示す。

ジクロロベンゼン類は、保持指標により化学物質の異性体を識別する必要性を把握するために添加した。添加した化学物質の同定のために利用した保持指標を表5に示す。

表4 化学兵器剤等のブラインド分析の結果

化学物質	添加量	正解率(%)
2-クロロアセトフェノン	2.0ppm	100(6/6)
m-クロロアセトフェノン	0.4ppm	100(2/2)
p-クロロアセトフェノン	0.8ppm	100(2/2)
2-ブロモアセトフェノン	8.0ppm	0(0/2)
p-ジクロロベンゼン	0.1ppm	100(4/4)
o-ジクロロベンゼン	0.1ppm	100(2/2)

(ご飯 0.5g または 1.0g に添加)

表5 添加した化学物質の保持指標

物質名	保持指標 (DB-5ms)
2-クロロアセトフェノン	1289.4
m-クロロアセトフェノン	1235.6
p-クロロアセトフェノン	1242.5
2-ブロモアセトフェノン	1370.1
p-ジクロロベンゼン	1020.7
o-ジクロロベンゼン	1039.1

2. 無機物質簡易検査キットによるシアン、ヒ素の迅速分析

検査キットによるシアン、ヒ素等の迅速分析は食品によっては擬陽性、擬陰性が認められるなど、精度管理に配慮する必要があるが、試験が容易で30分以内で結果が判明するなどスクリーニングとして有用である。実習では、お茶と牛乳に添加したシアンとヒ素それぞれ1ppmおよび10ppmを的確に検出することができた。

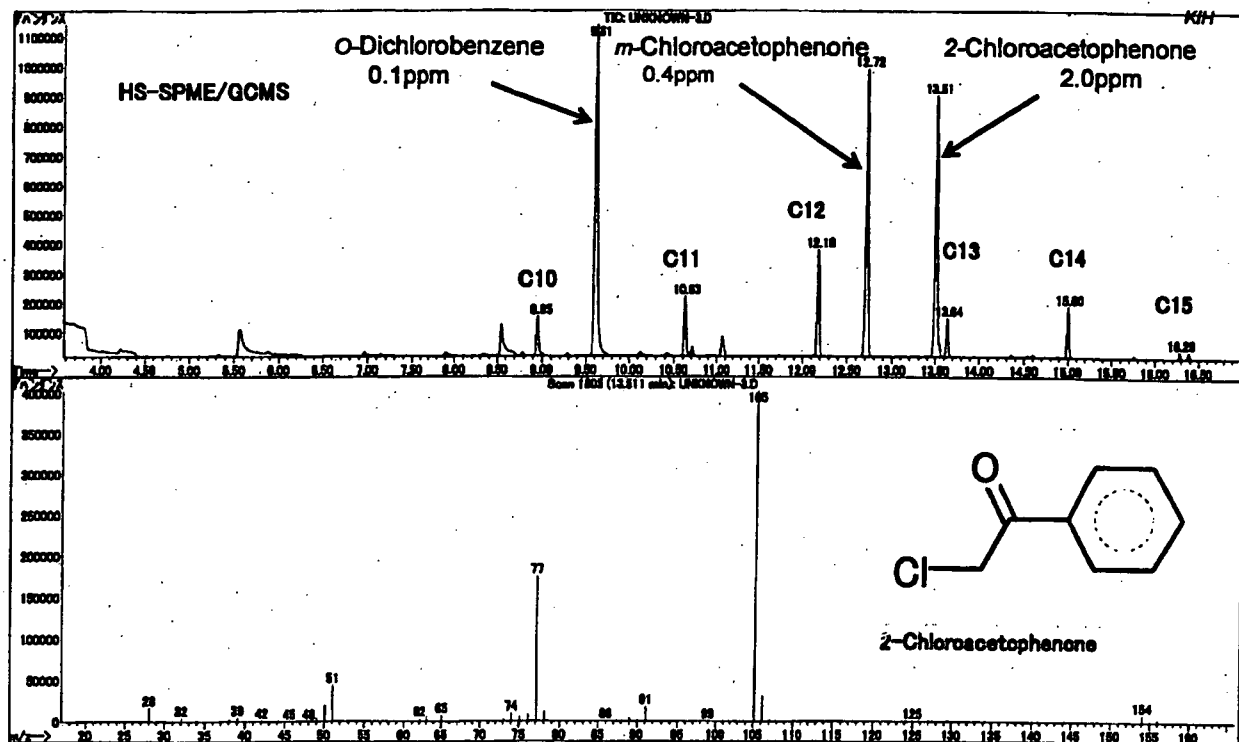


図1 トータルイオンクロマトグラム (上) および 2-クロロアセトフェノンのマススペクトル

この研修によって無機物質簡易検査キットの利点と問題点そして機器等が整備されていない事故現場等での有効性など論議を共有できたことは有意義であった。

またキャピラリー電気泳動装置による確認法も興味深く、有用な手法として今後の活用が期待される機器であることが理解できた。

2.1 ヒ素イオン簡易検査の結果

茶及び牛乳にヒ素イオンを 1ppm 添加し、キットを用いて呈色による判定を実施したところ、ヒ素の含有の有無を確認することができた。

2.2 シアンイオン簡易検査の結果

茶及び牛乳にシアンイオンを 10ppm 添加し、キットを用いて呈色による判定を実施したところ、シアンの含有の有無を確認することができた。

2.3 擬陽性例

過去に簡易検査キットを用いて蒸かまぼこを検査したところ、擬陽性が疑われた(2 ppm 程度)。他の試験法で存在を確認した結果、シアンイオンは検出されず、かまぼこの場合は擬陽性となるケースもあることが認められた。

2.4 シアンイオン確認検査の結果

シアンイオンを添加した試料では、シアンのピークが認められ、シアンの含有が確認できた。

なお、測定は間接測定で実施したため、吸光度の低下を検出しており、ピークは下に反転している。測定例を図2に示した。

3. 有害金属類の分析システム

ICP-MS による有害金属類の同定システムの研修ではICP-MSは超高感度(ppq~)であり、ダイナミックレンジも極めて広く(5~6桁)、溶液導入、標準試料の作成が容易、化

学的干渉が少ない、スペクトル干渉が少ない($m/z > 80$ では単純なスペクトル)、バックグラウンドが低くて一様に安定、元素の同定が容易という優れた特性を持つため、多元素同時分析(定量)が可能であり、健康危機管理という目的では、有害金属の特定に非常に優れた機器である。

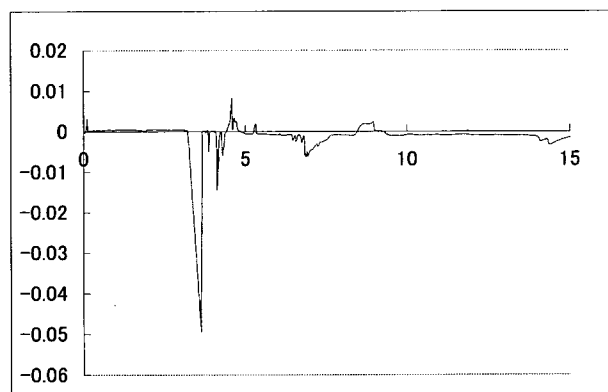
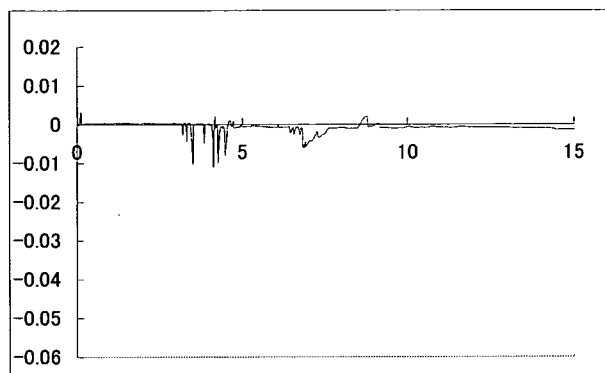


図2 キャピラリー電気泳動によるシアンイオンの測定例 (上段:茶、下段:シアンを添加)

マトリックスが少ない地下水、降水等の液体試料については、前処理をすることなくそのまま測定することが可能であるが、食品に含まれる有害金属を測定する場合は、マイクロウェーブを用いて試料を分解することにより、比較的簡単に試験液を調製することができる。特に健康危機発生時などは、高濃度な有害金属が混入していることが予想されるため試料を希釈して測定

することとなるが、このような場合、ICP-MSは特に威力を発揮することとなる。

【当日提起された主な質問と解決策】

Q 1 標準溶液の調製や試料の分解に用いる試薬類のグレードは？

A 1 すべて超高純度試薬を用いている。純水については市販の超純水か Milli Q システム程度以上が望ましい。

Q 2 市販の混合標準溶液をさらに混合しても問題はないか？

A 2 検量線を作成する場合には、液性の異なるもの(硝酸ベースと塩酸ベース等)は混合せず、それぞれ検量線を作成している。感度確認のためにサンプル分析の中間に挟んで測定する標準溶液はすべて混合しているが、短期間では問題ない。

Q 3 標準溶液及びサンプルをすべて酸溶液とする意味は何か？

A 3 金属元素は組合せによっては加水分解等により沈殿を生じる場合があること、容器内壁への吸着等を起こすことからある程度の濃度の酸溶液として安定化させる必要がある。特に、水銀や金の保存性は問題が多いので、注意が必要である。

Q 4 マイクロウェーブ分解装置を用いた食品の分解条件は？

A 4 食品の種類、性状等により異なると考えられるので、詳細な分解条件は試行錯誤的に検討する必要があるが、有機物を多く含有する試料については爆発等の危険性があるため、ごく少量の試料から検討を始めた方がよい。

Q 5 ICP-MS 分析に関し、健康危機事象では原因となる金属元素はかなり高濃度であると想定されるが、微量分析と同様の注意が必要か？

A 5 本日の講義は環境試料中の微量元素分析を想定して ICP-MS 分析の原則を説明したものであり、健康危機事象対応の目的に照らしてケース・バイ・ケースで考えることが必要である。

参加者からは非常にわかりやすい説明であったと好評であった。

D. 考察

1. 神戸市の化学物質に対する危機管理態勢

神戸市環境保健研究所における健康危機管理発生時の化学物質検査分析フローシートを図3に示す。項目毎にスクリーニング試験と確認試験を組み合わせた構成になっており、効率よく対象物質を特定出来るよう配慮されている。このうち、化学兵器剤、催涙スプレー剤、有機リン系農薬、カーバメート系農薬、有機溶剤類等は、毒性が強く分析の緊急性が高いため、迅速で精密分析が可能な Chemofind システムを用いて分析するよう位置づけられている。表6に Chemofind 2008 システムの構成を示す。

表6 Chemofind 2008 のシステム構成

装置	HP-5971、Agilent-5973
抽出・精製・濃縮・導入	SPME, TDS/CIS, SBSE(Twister) 溶媒抽出法
分析化合物	化学兵器剤、リン系農薬、カーバメート系農薬、その他 低・中極性化学物質)
分析試料	食品、水質、大気、土壌、血液、尿、胃洗浄液等
データベース	Chemofind 2008
MSライブラリー	Chemofind 2008、NIST 02、NIST 05

本研究では、微量の化学兵器剤を食品に添加し、他地研からの参加者が、ブラインド状態で Chemofind システムを用いて迅速に同定するという試験を行ったが、結果は極めて良好であった。このことは、Chemofind システムが、比較的操作しやすく、有害な有機化学物質を分析・同定する目的には適したものであることを示していると思われる。

2. 兵庫県の毒物混入事件発生時における検査体制について

兵庫県では兵庫県健康生活部健康危機管理基本マニュアルを定めており、健康危機管理に対応している。そのマニュアルは

- 1)目的
- 2)定義
- 3)健康危機管理の基本的な考え方
- 4)情報の収集と伝達
- 5)発生時の初期対応
- 6)発生時の諸活動



- 12)事後評価

の 12 章から成っており、本庁及び出先機

関（健康福祉事務所や研究センター）が連携して危機管理に対応することになっている。

また、実際の毒物検査の方法については、兵庫県毒劇物検査マニュアルが定められており、サンプリング、試料溶液の調製法及び検査操作等が示されている。そこに示された毒物検査の基本的な流れを次に示す。

2.1 飲食に起因する危害発生

喫食直後に異味を感じるとか、数時間以内に嘔吐等の症状が出現する場合に、化学毒物の簡易検査を各地域のセンター健康福祉事務所で行う。原因が化学物質かどうかを推定し、早期治療に役立てる。

2.2 事故現場の状況調査と試料採取

試料の外観調査（主に臭いと色調）とともに、事故現場の状況や現場付近での毒物や化学物質の有無を確認する。試料採取は食品で50g、液体試料で100mLを採取する。その1/10を化学毒物の簡易検査にまわし、残りは冷凍保存する。検査試料の対照として、喫食した飲食物と同じ製品を採取する。

2.3 化学毒物の簡易検査

試料は50～100倍希釈し、試料の状態に応じて、そのまま、ろ過、遠沈上澄み液を用いて行う。試料が少ない場合は、ヒ素とシアンのみを行い、残りの試料は健康環境科学研究センターへ直ちに搬入し、精密検査に廻す。

2.4 簡易検査の結果の評価

ヒ素、シアン、農薬の簡易検査で陽性であ

れば、毒物混入の可能性が推定できる。硝酸、亜硝酸はもともと食品中にも存在するため、検出した濃度を算出した後、毒物混入の判定を行う。

硝酸塩：野菜類に300～3000mg/kg通常含有する。亜硝酸塩：食肉製品の発色剤として70mg/kg以下の使用が可能である。

2.5 簡易検査後の措置

簡易検査で陽性（硝酸、亜硝酸を除く）のときは、毒物事件として警察に連絡し、警察の了解のもと、冷凍保存した試料の約半分を健康環境科学研究センターに搬入し、精密分析を行う。簡易検査で陽性にならない場合でも、毒物混入の疑いが消えない場合は警察（科捜研）に報告し、試料の半分を健康環境科学研究センターへ搬入して確認試験を行う。

2.6 健康環境科学研究センターでの精密分析

簡易検査の結果と事故状況の報告書を参考にし、健康環境科学研究センターの分析機器を総動員して精密分析を行う。毒物検査における健康福祉事務所と研究センターの役割分担と検査のフローを図4に示す。

2.7 研究センターにおける簡易検査の実績

兵庫県では、簡易キットを用いた測定は出先の健康福祉事務所が実施している。研究センターでは、簡易検査で陽性となったときに、簡易検査の再検査及び精密検査を実施するが現在まで、実際にヒ素やシアンが検出された事例はない。



図3 神戸市環境保健研究所における健康危機管理発生時の化学物質検査フローシート(項目別)

毒物混入が疑われる飲料水、食品の検査フローシート

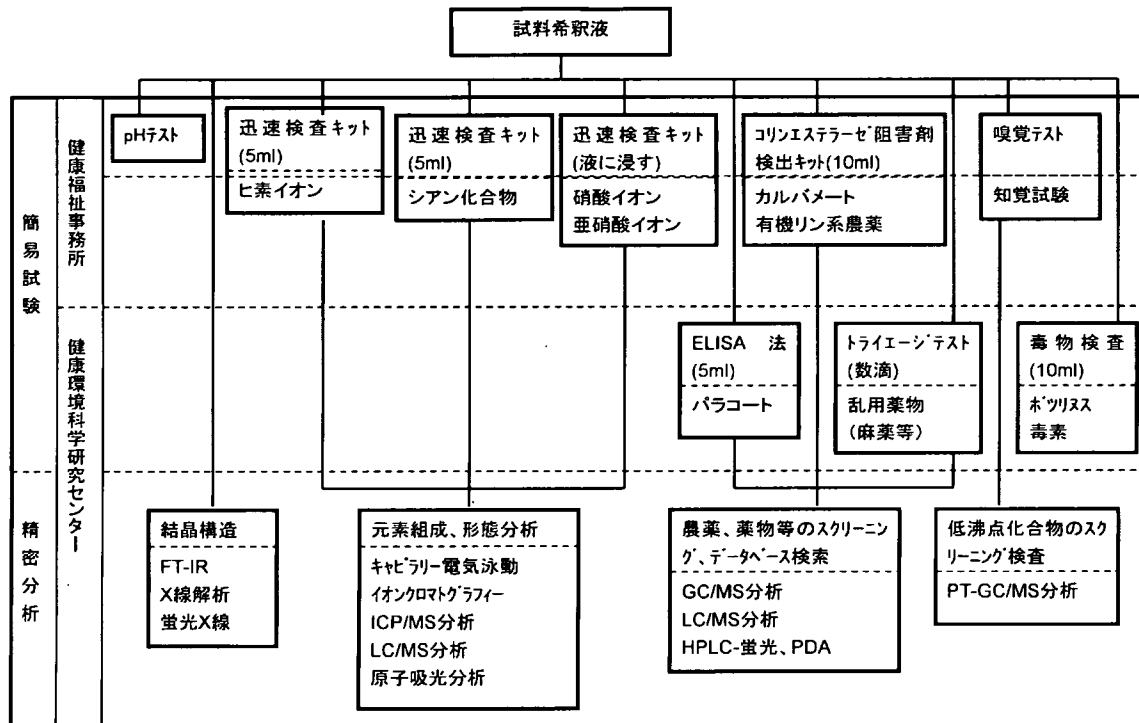


図4 兵庫県健康環境科学研究センターにおける健康危機管理発生時の役割分担および化学物質検査フローシート

3. 京都保健環境研究所の健康危機管理体制について

3.1 京都保健環境研究所においては、和歌山市の毒カレー事件を契機に、健康危機発生時に被害の拡大防止等を図るため、効率的で迅速な原因物質の調査、関連情報の提供及び本庁、保健所等への協力や連携を行うための必要事項を「京都府保健環境研究所健康危機管理要領」として定めている。

要領は大きく「平常時の対応」と「健康危機発生時に対応」の2つに分かれている。

平常時の対応は

- (1) 検査機器、検査マニュアルの整備
- (2) 標準株、標準品の確保
- (3) 安全の確保
- (4) 職員の連絡網
- (5) 資質向上、調査研究の推進
- (6) モニタリングデータ等の活用
- (7) 関係技術機関等との交流、情報連絡システムの構築等
- (8) 啓発活動等
- (9) 訓練等

また、健康危機発生時の対応は

- (1) 健康危機発生時の対応
- (2) 委員会の役割

- (3) 原因物質の探求
- (4) 情報の収集等
- (5) 関連情報の提供
- (6) 健康危機管理体制の解除

となっている。

また、組織としては毎年年度当初に情報班、微生物班、有機班、無機班の4班を編成し健康危機発生時に備えている。全体の関連を図5（上）に示す。

そのうち、情報班は各課選抜、微生物班は細菌・ウイルス課、有機班は理化学課、無機班は水質課を中心に構成し、残りの職員は各班に応援として振り分けている。

健康危機事象が発生した場合は、所長が事象に応じて所内の健康危機管理委員会を立ち上げ、そこで検査等の対応方針、原因物質の総合解析、保健所等他関係機関と協力・連携・応援体制等を協議・決定する仕組みとなっている。

情報班は搬入検体の受付やその台帳管理を行うとともに、情報を一元管理し、的確な情報の収集や内外部への発信など健康危機管理委員会の補佐的存在として位置付けられている。

また、各検査班では健康危機発生時に迅速・的確に原因物質を探求するための検査フローを作成し、簡易検査から精密検査まで手際よく検査が行えるよう体制を整えている。この関連を図5（下）に示す。

健康危機発生時には、得てして該当する課だけがあわただしく動き、他の課はほとんど関係ないという状況が

見られること、訓練以上のことは健康危機発生時にはできないことから、できるだけ全員で取り組むという姿勢を基本として、毎年、情報班が中心となって企画・立案し、訓練を実施している。

当所は平成15年度から訓練を継続的に行ってきたことから、職員の健康危機に対する意識は向上している。

3.2 ICP-MS の役割(食品部門、環境部門での利用の仕方等)

現在、食品および日用品に係る検査では、ICP-MS は公定法として採用されておらず、陶磁器の釉薬に含有される鉛の分析は原子吸光光度法が公定法となっている。

一方、水道部門では基準項目や水質管理目標設定項目の重金属類の分析は、ICP-MS も公定法となっている。水質部門（公共用水域、地下水、工場排水）においても、JIS K0102の改訂により、相当数の分析項目においてICP-MS も公定法（既定の方法と併記）となっている。大気部門においては有害大気汚染物質モニタリング事業で、ベリリウム、クロム、マンガン、ニッケル、ヒ素の分析に採用されている。

このように、水道、環境部門においてはICP-MSの公定法化が進んでいるが、食品部門においても健康危機事象に対応するために普段からICP-MS分析に習熟し、適用の可能性を検討しておく必要があると考えられる。